



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/18, C12N 15/51, 15/63, C07K 16/10, A61K 39/29, 39/42, G01N 33/576		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/58561
		(43) Date de publication internationale: 18 novembre 1999 (18.11.99)	
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01155 (22) Date de dépôt international: 14 mai 1999 (14.05.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/06335 14 mai 1998 (14.05.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS & VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): BARBAN, Véronique [FR/FR]; 3, rue Gustave Naudaud, F-69007 Lyon (FR). (74) Mandataire: GROS, Florent; Pasteur Mérieux Sérums & Vaccins, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: HEPATITIS C VIRUS MIMOTOPES			
(54) Titre: MIMOTOPES DU VIRUS DE L'HEPATITE C			
(57) Abstract			
<p>The invention concerns a peptide for the therapeutic or prophylactic treatment of hepatitis C, capable of reacting with a hepatitis C virus structure antigen specific antibody, comprising an amino acid sequence which imitates a conformational epitope of an antigen structure of said virus without, however, corresponding to a continuous amino acid sequence of said antigen, characterised in that said peptide comprises in particular assorted sequences 1 to 7. The invention also concerns a recombinant vector comprising a functional expression cassette for expressing a polynucleotide coding for said peptide. The invention further concerns a or composition for treating or preventing hepatitis C, in particular to be used as vaccine, whereof the active principle comprises said peptide, if required conjugate, and/or a recombinant vector coding for said peptide. The invention finally concerns the use of said peptide as reagent for diagnosing hepatitis C and/or susceptibility to chronicity in the event of hepatitis C infection.</p>			
(57) Abrégé			
<p>Peptide pour le traitement thérapeutique ou prophylactique de l'hépatite C, capable de réagir avec un anticorps spécifique d'un antigène de structure du virus de l'hépatite C, comprenant une séquence en acides aminés qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de structure dudit virus sans toutefois correspondre à une séquence continue d'acides aminés de cet antigène, caractérisé en ce que ce peptide comprend notamment au choix les séquences 1 à 7. Vecteur recombinant comprenant une cassette d'expression fonctionnelle permettant l'expression d'un polynucléotide codant pour un peptide selon l'invention. Composition thérapeutique ou prophylactique de l'hépatite C, notamment destiné à un usage vaccinal, dont le principe actif comprend un peptide de l'invention, le cas échéant conjugué, et/ou un vecteur recombinant codant pour ledit peptide. Utilisation d'un peptide selon l'invention en tant que réactif pour le diagnostic de l'hépatite C et/ou de la susceptibilité à la chronicité en cas d'infection établie par le virus de l'hépatite C.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun			PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

Mimotopes du Virus de l'hépatite C

La présente invention se rapporte au traitement et à la prévention de l'hépatite C et notamment à tout peptide mimant des épitopes conformationnels d'antigènes de structure
5 du virus de l'hépatite C (VHC) et à tout poly nucléotide intégré dans un vecteur permettant l'expression desdits peptides et leur utilisation à des fins thérapeutiques, prophylactiques, notamment vaccinales, et/ou de diagnostiques.

Domaine de l'invention

10

Le VHC est un virus enveloppé à ARN à brin positif et représente l'agent étiologique majeur de l'hépatite non-A, non-B. Ce virus est impliqué dans les infections chroniques du foie et dans les complications tardives conduisant à une cirrhose du foie et à un carcinome hépato-cellulaire (HCC). Le virus est principalement transmis par le sang.

15

Les réactions immunitaires en réponse à l'infection semblent limitées ou tout au moins inadéquates, la chronicité apparaissant dans 80 % des cas après infection primaire. Les patients chroniquement infectés ont des taux sanguins anormalement élevés en enzymes provenant de la nécrose des cellules hépatiques, notamment en alanine
20 aminotransférase (ALAT), un taux élevé d'anticorps spécifiques des antigènes viraux et présentent une virémie détectable par RT-PCR. Des études prospectives menées sur des donneurs de sang ont montré la coexistence de taux significatifs d'anticorps anti-HCV, de taux normaux en ALAT, et d'une virémie transitoire ou fluctuante ce qui suggère l'existence de porteurs sains de l'infection.

25

Il n'existe pas aujourd'hui de test commercialement disponible qui permet d'analyser la réponse humorale en distinguant les malades porteurs chroniques d'HCV, des patients ayant contractés une infection ancienne dont ils sont guéris, ou des porteurs sains.

30

La cible principale du diagnostic HCV est la protéine structurale de la nucléocapside. Cette protéine est bien conservée parmi les différents génotypes d'HCV et les anticorps anti-capside sont présents chez la majorité des patients chroniquement infectés. (Manzini, P. et al., 1993. Liver 13:222-226 ; Bukh, J., et al. 1994. P.N.A.S. 91:8239-8243 ; Harada, S., et al. 1991. J. Virol. 65:3015-3021). Par exemple, la protéine
35 recombinante C22-3, couvrant les acides aminés de 2 à 120 de la nucléocapside est le composant majeur des tests commerciaux anti-HCV dit "de seconde génération" (Hosein, B., et al. 1991. P.N.A.S. 88:3647-3651 ; Grakoui, A., et al. 1993. J. Virol. 67:2832-2843).

Le génome du virus de l'hépatite C consiste en 2 portions non codantes situées respectivement aux extrémités 5' et 3' du génome encadrant un seul segment ouvert de lecture (ORF) qui code pour 3 protéines de structure (la protéine nucléocapsidique ou core (C), et les deux protéines d'enveloppe E1 et E2) et 6 protéines non structurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a et NS5b) (Bukh, J., et al. 1995 Seminars in liver disease 15 : 41-63). Un précurseur poly protéique unique (Grakoui, A., et al. 1993. J. Virol 67:1385-1395 ; Grakoui, A., et al. 1993. P.N.A.S. 90:10583-10587 ; Grakoui, A., et al. 1993. J. Virol. 67:2832-2843 ; Tanji, Y., et al. 1994. J. Virol 68:8418-8422 ; Manabe, S., et al. 1994. Virology 198:636-644) est directement traduit à partir de l'ARN viral (Choo, Q.L. et al. 1989. Science 244:359-352) et subit des modifications post-traductionnelles à la fois par les protéases de l'hôte et par des protéases virales (Manabe, S., et al. 1994. Virology 198:636-644 ; Hijikata, M., et al. 1993. J. Virol 67:4665-4675). Les protéines structurales, qui consistent en la capsid C et les deux protéines d'enveloppe E1 et E2, sont générées par coupures séquentielles dans le premier tiers de la poly protéine, tandis que les protéines non structurales (NS2, NS3, NS4 et NS5) sont générées à partir des deux tiers restant.

Plusieurs études basées sur la modélisation de la protéine avec des peptides synthétiques ont indiqué que la nucléocapside du HCV contient plusieurs épitopes linéaires fortement immunogènes (Chiba, J., H. et al. 1991. P.N.A.S. 88:4641-4645 ; Yoshikawa, A., K. et al. 1992. J. Immunol. Meth. 148:143-150 ; Parmley, S.F., et al. 1988. Gene 73:305-318 ; Winter, G., et al. Annu Rev Immunol 12:433-455 ; Kohler, G., et al. 1975. Nature : 495-497 ; Huse, W.D., et al. 1989. Science 246:1275-1281 ; Hoogenboom, H.R., et al. 1992. Immunol Rev 130:41-68 ; Burton, D.R., et al. 1994. In Advances in Immunology, Vol 57, vol. 57.F.J. Dixon, ed. Academic Press Inc, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, CA 92101-4495, p. 191-280 ; Marks, J.D., et al. 1992. Bio/Technology 10:779-783 ; Waterhouse, P., et al. 1993. Nucleic Acids Res 21:2265-2266 ; Mc Cafferty, J., et al. 1990. Nature 348:552-554). Inversement, on sait très peu de chose à propos des épitopes naturels, conformationnels de la nucléocapside. Cela est principalement dû au fait que très peu d'anticorps ont été produits à partir d'individus infectés par HCV (Siemoneit, K., et al. 1994. Hybridoma 13:9-13 ; Cerino, A., et al. 1993. J. Immunol. 151:7005-7015 ; Akastuka, T., et al. 1993. Hepatology 18:503-510)).

Résumé de l'invention

35

Face à la problématique liée au risque important de développement d'hépatocarcinome ou de cirrhose consécutif à l'infection par le VHC le besoin existe d'identifier

une composition pharmaceutique permettant de traiter efficacement ou de prévenir cette affection virale.

Il existe aussi un besoin de développer des réactifs rentrant notamment dans la composition de kits immunologiques qui permettent de distinguer entre les porteurs sains, les malades chroniquement infectés et les sujets guéris qui ont fait une infection ancienne.

La présente invention vise à pallier ces besoins en identifiant des structures peptidiques pour le traitement thérapeutique ou prophylactique de l'hépatite C capable de réagir avec un anticorps spécifique d'un antigène de structure du VHC, comprenant une séquence en acides aminés qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de structure dudit virus sans toutefois correspondre à une séquence continue d'acides aminés de cet antigène, caractérisé en ce que ce peptide comprend notamment au choix les séquences 1 à 7 suivantes

SEQ ID NO : 1	Gln-Leu-Ile-Thr-Lys-Pro-Leu
SEQ ID NO : 2	His-Ala-Phe-Pro-His-Leu-His
SEQ ID NO : 3	Ser-Ala-Pro-Ser-Ser-Lys-Asn
SEQ ID NO : 4	Gly-Glu-Thr-Arg-Ala-Pro-Leu
SEQ ID NO : 5	Ser-Val-Ser-Val-Gly-Met-Lys-Pro-Ser-Pro-Arg-Pro
SEQ ID NO : 6	Trp-Gln-Ser-Tyr-Pro-Met-Phe-Asn-Asn-Thr-Leu-Thr
SEQ ID NO : 7	Met-Leu-Pro-Ser-Val-Leu-Asp.

La présente invention concerne également tout vecteur recombinant comprenant une cassette d'expression fonctionnelle permettant l'expression d'un polynucléotide codant pour un peptide répondant aux critères définis ci dessus.

La présente invention concerne aussi une composition thérapeutique ou prophylactique de l'hépatite C, notamment destiné à un usage vaccinal, dont le principe actif comprend un peptide répondant aux critères définis ci dessus et/ou un vecteur recombinant codant pour ledit peptide.

Enfin la présente invention concerne aussi l'utilisation d'un peptide répondant aux critères définis ci dessus en tant que réactif pour le diagnostic de l'hépatite C et/ou de la susceptibilité à la chronicité en cas d'infection établie par le virus de l'hépatite C, ledit diagnostic comprenant l'évaluation, à partir d'un échantillon de sang, de la réponse humorale et/ou à médiation cellulaire spécifique de ce peptide.

L'utilisation d'un peptide répondant aux critères définis ci dessus en tant que réactif pour le diagnostic de l'hépatite C et/ou de la susceptibilité à la chronicité en cas d'infection établie par le virus de l'hépatite C, ledit diagnostic comprenant l'évaluation de la réponse d' hypersensibilité retardée consécutive à l'administration intradermique ou sous cutanée de ce peptide.

L'utilisation d'un peptide répondant aux critères définis ci dessus et/ou d'un vecteur recombinant codant pour ledit peptide pour la préparation d'une composition thérapeutique ou prophylactique destinée au traitement ou a la prévention de l'hépatite C.

Description de l'invention

Dans le contexte de la présente invention, différents termes employés sont ci-après définis:

"Par peptide" on entend une séquence d'au moins 6 acides aminés liés entre eux par une liaison peptidique obtenu par synthèse chimique ou par des techniques de recombinaison génétique, de préférence entre 6 et 50 acides aminés et notamment entre 20 et 40 acides aminés.

"Par antigène de structure" on entend une entité moléculaire qui se lie au moins à un anticorps spécifique tout en participant également à la configuration spatiale de l'objet dont il est issu, en l'occurrence ici le VHC.

"Par épitope conformationnel" on entend une molécule qui constitue le site de liaison spécifique à un anticorps et qui est représentée par une séquence d'acides aminés qui ne correspond pas à une séquence continue en acides aminées de la protéine naturelle contre laquelle est dirigé cet anticorps. De préférence, cette séquence en acides aminés de l'épitope conformationnel n'est pas homologue à une séquence continue en acides aminés de la protéine naturelle, l'homologie étant définie par la combinaison des deux critères

- le critère d'identité des acides aminés déterminé par le rapport entre le nombre d'acides aminés d'un peptide selon l'invention qui sont identiques à ceux d'une séquence de même taille portée par la protéine naturelle, et le nombre total d'acides aminés dudit peptide. De préférence l'identité en acides aminés ne dépassera pas de préférence 50%, voire 60% ou 70% ou 80% ou même 90%.

- Le critère d'identité d'enchaînement déterminé par le rapport entre le nombre d'acides aminés d'un peptide selon l'invention qui sont à la fois identiques et se trouvent à la même position d'enchaînement que ceux d'une séquence de même taille portée par la protéine naturelle, et le nombre total d'acides aminés dudit peptide. De préférence l'identité d'enchaînement ne dépassera pas 70 à 80%.

"Par mimotope" on entend un épitope qui mime la structure tridimensionnelle d'un autre épitope en se fixant sur le site de liaison spécifique du même anticorps

- 10 "Par CDR3" on entend la région hyper variable d'enchaînement en acides aminés de la chaîne lourde et légère des immunoglobulines et qui se situe au niveau du site d'interaction spécifique avec l'épitope.

- 15 "Par conjugué" on entend l'association du peptide tel que défini dans l'invention à toute autre molécule, par des procédés physiques ou chimiques, ayant pour vocation d'induire ou de renforcer l'immunogénicité du peptide de départ.

- 20 "Par immunogénicité" on entend la capacité d'une entité moléculaire, après inoculation à un mammifère, à induire une production d'anticorps spécifiquement dirigé contre cette entité.

- 25 "Par poly nucléotide" on entend soit une séquence d'ARN, soit une séquence d'ADN, soit d'une séquence d'ADNc résultant de la transcription inverse d'une séquence d'origine naturelle ou de synthèse, avec ou sans bases modifiées.

- "Par voie muqueuse", on entend un mode d'administration qui met en contact directement la composition pharmaceutique avec les différents types de muqueuses de l'organisme.

- 30 "Par voie parentérale", on entend un mode d'administration qui met directement en contact la composition pharmaceutique avec les tissus ou organes interne de l'organisme.

- 35 L'invention vise donc tout peptide qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de structure du virus de l'hépatite C et qui est reconnu par un anticorps spécifique de cet antigène. Un peptide selon l'invention peut être représenté avantageusement par l'une des 7 séquences telle que suit

	SEQ ID NO : 1	Gln-Leu-Ile-Thr-Lys-Pro-Leu
	SEQ ID NO : 2	His-Ala-Phe-Pro-His-Leu-His
	SEQ ID NO : 3	Ser-Ala-Pro-Ser-Ser-Lys-Asn
	SEQ ID NO : 4	Gly-Glu-Thr-Arg-Ala-Pro-Leu
5	SEQ ID NO : 5	Ser-Val-Ser-Val-Gly-Met-Lys-Pro-Ser-Pro-Arg-Pro
	SEQ ID NO : 6	Trp-Gln-Ser-Tyr-Pro-Met-Phe-Asn-Asn-Thr-Leu-Thr
	SEQ ID NO : 7	Met-Leu-Pro-Ser-Val-Leu-Asp.

Des peptides synthétiques, représentant des épitopes linéaires et très
 10 immunogéniques de la nucléocapside ont déjà été identifiés par l'homme du métier
 (Siemoneit, K., et al. 1994. Hybridoma 13:9-13 ; Cerino, A., et al. 1993. J. Immunol.
 151:7005-7015 ; Akastuka, T., et al. 1993. Hepatology 18:503-510) sans toutefois être
 capable d'isoler des épitopes conformationnels.

15 A partir d'une banque combinatoire d'anticorps obtenue à partir du sang
 périphérique d'un porteur sain asymptomatique du virus de l'hépatite C, défini en ce que la
 sérologie vis à vis du VHC est positive, que le taux d'ALAT est normal et qu'il n'y a pas de
 virémie détectable par PCR, et d'une librairie synthétique de peptides, on peut identifier,
 20 par le biais de mimotopes, de nouveaux épitopes conformationnels présents sur les
 antigènes de structure du VHC, notamment des épitopes qui peuvent se situer dans la région
 comprise entre les acides aminés 1 à 72 de la nucléocapside et en particulier dans la région
 comprise entre les acides aminés 1 à 20 de la nucléocapside, de même que des épitopes qui
 se situent dans la région comprise entre les acides aminés 1 à 191 et la région comprise
 25 entre les acides aminés 235 à 242 de la protéine d'enveloppe E1 ainsi que les épitopes qui se
 situent dans la région comprise entre les acides aminés 1 à 396 et la région comprise entre
 les acides aminés 429 et 570 de la protéine d'enveloppe E2. L'identification de ces
 mimotopes a nécessité pour leur mise en œuvre d'un processus technologique sophistiqué, à
 savoir :

- 30 -la constitution d'une librairie combinatoire d'anticorps suffisamment complexe pour
 refléter au mieux le répertoire naturel en anticorps d'un individu, et de façon avantageuse le
 répertoire en anticorps d'un individu porteur sain du VHC ;
 la sélection au sein de cette banque, d'anticorps recombinants spécifiques d'antigènes de
 structure du VHC ;
- 35 -la sélection de peptides spécifiques des anticorps recombinants, à partir d'une librairie
 synthétique aléatoire de peptides obtenue par recombinaison moléculaire, la dite sélection
 pouvant se faire par ELISA ;

-la caractérisation de ces peptides comme étant des mimotopes d'épitopes conformationnels du VHC en ce qu'il n'y a pas de correspondance entre la séquence en acides aminés dudit peptide avec une quelconque séquence continue en acides aminés retrouvés dans les antigènes de structure du VHC d'une part et d'autre part en ce que ce peptide est capable d'inhiber l'interaction de l'anticorps recombinant avec l'antigène de structure qui a servi à la sélection du dit anticorps recombinant.

Pour ce criblage on peut isoler deux anticorps recombinants spécifiques, par exemple. Le premier, désigné rFabC14, se caractérise principalement dans les chaînes V_{H3} lourdes par un CDR3 (Complementary-Determining Region) de séquence DLYYDDMSYE, soit en code à 3 lettres Asp-Leu-Tyr-Tyr-Asp-Asp-Met-Ser-Tyr-Glu (SEQ ID NO : 8), et dans les chaînes légères $V_{\lambda 1}$ d'un CDR3 de séquence GTWDNSLSA, soit Gly-Thr-Trp-Asp-Asn-Ser-Leu-Ser-Ala (SEQ ID NO : 9). Le deuxième, désigné rFabC3, se caractérise principalement dans les chaînes V_{H3} lourdes par un CDR3 de séquence DPLEYFDTSDYDFVDF, soit Asp-Pro-Leu-Glu-Tyr-Phe-Asp-Thr-Ser-Asp-Tyr-Asp-Phe-Val-Asp-Phe (SEQ ID NO : 10), et dans les chaînes légères $V_{\kappa 4}$ d'un CDR3 de séquence QQYYSTP, soit Gln-Gln-Tyr-Tyr-Ser-Thr-Pro (SEQ ID NO : 11).

L'homme du métier peut utiliser tout anticorps ayant un squelette de structure V_{H3} , $V_{\lambda 1}$ pour produire rFabC14 et tout anticorps de structure V_{H3} , $V_{\kappa 4}$ pour produire rFabC3. Il peut facilement reproduire ces anticorps, ayant les mêmes caractéristiques de reconnaissance, la production d'anticorps recombinants par mutagénèse ou clonage à partir de CDR d'intérêt faisant partie des capacités normales de l'homme du métier.

Ainsi des anticorps chimères composés de séquences d'acides aminés humaines et non humaines peuvent être formés comme décrit par Winter et al. (1991) Nature 349 : 293 ; Lobuglio et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86 : 4220 ; Shaw et al. (1987) J Immunol. 138 : 4534 ; and Brown et al. (1987) Cancer Res. 47 : 3577 ; Riechmann et al. (1988) Nature 332 : 323 ; Verhoeyen et al. (1988) Science 239 : 1534 ; Jones et al. (1986) Nature 321 : 522 ; EP-A-519,596, ; GB-A-2,276,169.

Pour induire ou plutôt renforcer l'immunogénicité du peptide mimant un épitope conformationnel du VHC, la présente invention a également pour objet des peptides comprenant une répétition (2 ou plus) du peptide conforme à l'invention ou une combinaison de différents peptides conformes à l'invention, ainsi qu'à des peptides comprenant à la fois des répétitions et des combinaisons.

Dans de tels cas, les peptides peuvent être joints par des liaisons covalentes ou des liaisons non covalentes, par exemple, on peut citer avantageusement la méthode développée par Posnett et al (J. Biol. Chem. (1988) 263: 1719) qui n'altère pas le ou les épitopes porté par les peptides et aboutit à la formation d'octamères du même peptide ou de peptides différents.

Dans le cadre notamment des préparations antigéniques et des formulations vaccinales qui sont décrites ci-après, on peut aussi préférer conjuguer par liaison covalente les peptides de l'invention à des molécules immunogènes usuellement utilisées pour rendre immunogène les peptides de petite taille.

Les peptides selon l'invention peuvent ainsi être conjugués aux protéines immunogènes connues telles que les sérum albumines, thyroglobuline, ovalbumine, gélatine, hémocyanine (e.g. Keyhole Limpet Haemocyanin KLH), séroglobulines, anatoxine tétanique, etc. ou à des épitopes T helper parmi lesquelles on peut citer le thératope.

Les techniques de conjugaison sont aussi parfaitement connues de l'homme de l'art. On peut recourir par exemple aux agents hétérobifonctionnels tels que SPDP, carbodiimide, glutaraldéhyde, système biotine/avidine, etc.

On peut aussi coupler les peptides à des lipopolysaccharides, polysaccharides, l glycopeptides, analogues du muramyl peptide, acides gras, etc. De préférence, on effectue le couplage d'un peptide avec un acide gras du type palmitoyl-lysine tel que décrit dans EP 491628 (Biovector) ou (Pam)₃ Cys-Ser tel que décrit dans EP547681 (Merck), par exemple, le contenu technique desdits brevets étant incorporé par référence dans l'objet de l'invention.

Les méthodes pour lier de manière opérationnelle des peptides individuels par des chaînes latérales portant des résidus d'acide aminé, afin de former un conjugué immunogène, par exemple un polymère polypeptidique ramifié, sont aussi bien connues de l'homme de l'art. Par ces méthodes, on cherche à établir des liaisons sur différentes chaînes latérales par un ou plusieurs types de groupes fonctionnels afin d'obtenir une structure dans laquelle les structures peptidiques sont liées par covalence tout en étant séparées par au moins une chaîne latérale. Comme groupes fonctionnels, on peut citer les groupes aminés epsilon, les groupes bêta- ou gamma carboxylique, les groupes thiol (-SH) et les cycles aromatiques (par exemple tyrosine et histidine). Des méthodes pour lier des polypeptides à l'aide de ces groupes fonctionnels sont décrites dans Erlanger (1980 Method of

Enzymology, 70 : 85), Aurameas et al. , (1978 Scand. J. Immunol. , Vol.8, suppl. 7, 7-23) et US-A-4 193 795. En outre, il est également possible de mettre en œuvre une réaction de couplage dirigée telle que décrite dans Rodwell et al. , (1985 Biotech 3, 889-894). Les peptides peuvent également être modifiés pour incorporer des bras d'espacement tels que
5 hexaméthylène diamine ou d'autres molécules bi-fonctionnelles de tailles similaires.

Les peptides peuvent être également formulés avec de l'alum, du monophosphoryl Lipid A, pluronics, SAF1, Ribi trehalose-6,6-dimycolate ou autres composés immunostimulants connus de l'homme de l'art pour accroître l'immunogénicité du peptide
10 auquel ces composés sont liés.

Néanmoins toutes ces méthodes de conjugaison, de modification, de répétition ou de combinaison de peptides conformes à l'invention doivent respecter au mieux la conformation originelle du peptide.
15

La présente invention a aussi pour objet les fragments d'ADN isolés codant pour les peptides selon l'invention et pouvant être utilisés pour produire les peptides par expression de la séquence d'ADN dans un système d'expression approprié. En tenant compte de la dégénérescence du code, l'homme de l'art est parfaitement à même de déterminer les
20 différentes séquences d'ADN aptes à coder pour les différents peptides conformes à l'invention.

Selon un premier aspect de l'invention, le système d'expression est un système d'expression in vitro pour la production des peptides en vue de leur utilisation ultérieure, e.
25 g. comme réactif de diagnostic, comme composant antigénique ou comme composant vaccinal. De tels systèmes ou vecteurs d'expression in vitro sont parfaitement connus de l'homme du métier et l'on peut citer à titre d'exemple les bactéries telles que E. Coli, les cellules eucaryotes telles que les levures, notamment S. cerevisiae, le baculovirus, notamment propagé sur cellules d'insectes, etc.
30

L'invention a donc aussi pour objet une cassette d'expression comprenant un tel fragment d'ADN et des séquences régulatrices permettant l'expression de ce fragment d'ADN dans un système d'expression in vitro approprié.

35 Selon un deuxième aspect de l'invention le système d'expression est un système d'expression in vivo pour générer chez le patient traité une réaction immunitaire, de préférence protectrice. En d'autres termes, le système d'expression, qui peut être réplicatif

ou non réplicatif, va exprimer le peptide in vivo. L'homme du métier a à sa disposition de tels systèmes. A titre d'exemples préférés, on peut citer les plasmides, notamment plasmides nus, e. g. selon WO-A-90 11092, WO-A-93 19813, WO-A-94 21797 et WO-A-95 20660, les poxvirus, tels que le virus de la vaccine et les pox aviaires (fowlpox, pigeonpox, canarypox, etc.), les adénovirus, etc.

L'invention a donc aussi pour objet des cassettes d'expression comprenant un tel fragment d'ADN et les moyens de régulation de l'expression dans le système d'expression choisi. Elle a aussi pour objet le système d'expression ou vecteur d'expression, comprenant une telle cassette d'expression, en particulier plasmide, poxvirus, adénovirus, comme vu ci-dessus.

L'invention se rapporte également à l'utilisation d'au moins un peptide conforme à l'invention en association ou non avec au moins un vecteur recombinant conforme à l'invention pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir ou à guérir d'une affection liée à l'hépatite C. Une composition selon l'invention peut comprendre des préparations pouvant être sous forme de crèmes, de poudres lyophilisées ou non, de solutions, de suspensions, pour des administrations par voie muqueuse telle qu'oral, nasal, rectal, génital, cutanée, par exemple. Pour des administrations parentérales telle que intra dermique, sous cutanée, intra musculaire, intra veineuse, intra artériel, intra lymphatique ou intra péritonéale, par exemple, les préparations injectables stériles pourront être selon les cas sous forme de solutions, de suspensions ou d'émulsions. Outre le ou les principes actifs, conforme à l'objet de l'invention, les préparations pourront contenir des excipients et/ou des agents stabilisants adaptés au mode d'administration.

Les préparations destinées à un usage vaccinal pourront également contenir des adjuvants ou être incorporées dans des systèmes de délivrance compatibles avec un usage en médecine humaine. On peut rapporter notamment l'usage des adjuvants comme l'Alum (Aluminium phosphate ou hydroxyde d'aluminium) incorporé de façon classique dans les vaccins, l'adjuvant incomplet de Freund, Lipide A monophosphorylé (MPL), QS21, Polyphosphazène, muramyl dipeptide (MDP) ou ses dérivés, l'usage de système de délivrance de l'antigène comme les émulsions (MF59, SAF1, RIBI, SB 62), les ISCOMS, les liposomes, les micro sphères composées de polymères de PLGA de diamètre bien calibré, ou éventuellement les pseudo virions.

Les doses et voies d'administration de ces compositions pharmaceutiques seront déterminées en prenant en compte la nature de la composition, le niveau d'expression du

peptide d'intérêt par le vecteur recombinant s'il est inclus dans la préparation, de l'âge, du sexe et du poids de l'individu recevant la préparation. Il sera également tenu compte de l'importance relative de la molécule porteuse dans le conjugué s'il est inclus dans la composition.

5

Compte tenu de tous ces facteurs qui sont connus et appréciés par l'homme du métier, les doses de peptides administrées pourront atteindre 1 à 5 mg mais plus généralement se situeront entre 5µg et 1 mg par injection, de préférence 50 à 500µg. Le vecteur recombinant codant pour le peptide d'intérêt pourra être administré ou utilisé pour transfecter ou infecter les cellules d'intérêt à une dose minimale de $10^{3.5}$ unités infectantes (pfu). De façon préférentielle, le vecteur recombinant sera utilisé dans une échelle de dose allant de 10^4 à 10^{10} pfu en fonction de l'efficacité d'expression du peptide par ce vecteur et notamment dans une échelle de dose allant de 10^6 à 10^9 pfu, par exemple. Lorsque la composition pharmaceutique comprend plusieurs vecteurs recombinant codant pour des peptides d'intérêt différent, il est bien entendu que ces mêmes échelles de doses pourront être appliquées à ces combinaisons. L'homme de l'art pourra se référer aux protocoles et essais cliniques utilisant des préparations à base de vecteurs recombinants, notamment les pox virus recombinants, les adenovirus recombinants, déjà réalisés chez l'homme pour convenir du nombre approprié de pfu que doit renfermer la composition pharmaceutique.

20

Lorsque la composition pharmaceutique comprend un plasmide contenant le système d'expression du peptide d'intérêt, le dosage devra être suffisant pour induire une réponse au moins équivalente à celle du produit sous forme de peptide modifié ou non et/ou induire un niveau d'expression du peptide équivalent à celui obtenu à l'aide des vecteurs recombinants déjà cités. Par exemple, les quantités de plasmides contenus dans les compositions pharmaceutiques pourront se situer dans des échelles allant de 1µg à 100mg, de façon préférentielle entre 0,1mg à 10mg. L'homme de l'art pourra se référer aux protocoles et essais cliniques déjà réalisés chez l'homme, utilisant des préparations d'ADN plasmidique pour convenir de la dose de plasmide que doit renfermer la composition pharmaceutique.

30

Pour la prévention de l'hépatite C, la composition pharmaceutique pourra être administrée en une seule fois ou à plusieurs reprises pour atteindre le niveau de réponse désirée, notamment le niveau et la qualité de la réponse anticorps et/ou à médiation cellulaire spécifique désirée, identifiée comme celle garantissant la protection vis à vis d'une contamination accidentelle. Pour atteindre cet objectif il pourra être nécessaire, outre la composition de la préparation, la voie d'administration choisie, de respecter les délais

35

impartis entre chaque injection, qui peuvent être de façon préférentielle de 1 mois, 2 mois ou 6 mois et/ou de faire usage de façon combinée ou sériée pendant la durée du protocole médical, notamment vaccinal, de compositions pharmaceutiques différentes se rapportant au peptide, au vecteur recombinant ou au plasmide d'intérêt que l'homme de l'art est capable de maîtriser. Il pourra être également nécessaire pour maintenir le niveau de protection de pratiquer des injections de rappel à intervalles réguliers.

Pour le traitement de l'hépatite C la composition pharmaceutique, notamment vaccinale, pourra être administrée en une seule fois ou à plusieurs reprises et de façon pouvant être très rapprochée, notamment dans des délais inférieurs à une semaine, pour atteindre le niveau de réponse désirée, notamment celui qui permet de constater l'absence de virus de l'hépatite C dans le sang par le test PCR. A titre d'exemple, l'homme de l'art pourra se référer au protocole utilisé par Pol S., et al. 1998 Acta Gastroenterol. Belg. 61:228, pour le traitement de l'hépatite B chronique utilisant un antigène vaccinal de l'enveloppe de l'hépatite B. Au besoin, la composition pharmaceutique comprenant le peptide, le vecteur ou le plasmide d'intérêt pourra être associé ou utilisé en alternance avec un traitement conventionnel de cette affection, notamment l'interféron α .

Que ce soit pour la prévention ou le traitement de l'hépatite C il pourra être également utile d'utiliser la composition pharmaceutique comprenant un ou plusieurs peptides d'intérêt, le ou les vecteurs recombinants d'intérêt correspondants ainsi que le ou les plasmides d'intérêt pour stimuler les cellules du système immunitaire du patient in vitro ou ex vivo et de les réinjecter ensuite dans l'organisme de l'individu. Cette méthodologie a notamment été développée dans le traitement immunothérapeutique du cancer.

L'invention a pour objet enfin l'utilisation des peptides d'intérêt en tant que réactif pour le diagnostic de l'hépatite C et/ou de la susceptibilité à la chronicité en cas d'infection établie. Pour la première fois des épitopes conformationnels d'antigènes de structure du VHC ont été définis. On peut donc utiliser ces peptides, à des fins diagnostiques, pour rechercher préférentiellement des anticorps protecteurs du VHC, qui, très souvent reconnaissent des épitopes conformationnels et permettre ainsi de distinguer les individus porteurs sains ou ayant contracté une infection ancienne dont ils sont guéris (possédant des anticorps protecteurs) de ceux qui sont chroniquement infectés (ne possédant pas d'anticorps protecteurs).

La présente invention a donc aussi pour objet une méthode de diagnostic de l'hépatite C et/ou de susceptibilité à la chronicité en cas d'infection établie, la dite méthode

étant basée sur l'analyse de la réponse humorale, de la réponse à médiation cellulaire et/ou de la réponse d'hypersensibilité retardée.

5 Pour l'analyse de la réponse humorale on pourra utiliser des méthodes immuno-enzymatiques, radio-immunologies ou de western blotting bien connues de l'homme du métier, comme par exemple les méthodes ELISA, RIA, RIPA ou IRMA.

10 Pour l'analyse de l'immunité à médiation cellulaire on pourra mettre en contact les peptides conforme à l'invention avec des cellules humaines du système immunitaire et évaluer la réponse lymphoproliférative spécifique comme cela est bien connu de l'homme du métier. On peut enfin évaluer la réponse d'hypersensibilité retardée en administrant le peptide d'intérêt par voie intra dermique ou sous cutanée et en mesurant l'intensité de la réponse inflammatoire locale tardive qui s'observe généralement dans un délai d'au moins 6 heures après l'injection et de façon préférentielle entre 18 et 48 heures après l'injection.

15

Description des figures

20 La figure 1 représente les caractéristiques de reconnaissance des 12 isolats "positifs" vis à vis de différents fragments de la nucléocapside du VHC (antigènes M48, S18D, V22G et P42Y) par ELISA.

25 Les figures 2-4 représentent les courbes d'inhibition de la liaison, respectivement, du FabC3 soluble, du FabC14 soluble et de l'anticorps monoclonal 2C6F6 à l'antigène de la nucléocapside M48 en présence de concentrations croissantes (de raison 10) en peptides ayant pour séquences QLITKPL, HAFPHLH ou SAPSSKN, obtenues par compétition en ELISA.

30 La présente invention est décrite plus en détail ci-après à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de sélection d'anticorps dirigés contre les antigènes de structure du VHC, de sélection de peptides selon l'invention, de compositions vaccinales selon l'invention et d'utilisation des peptides selon l'invention pour le diagnostic de l'hépatite C. Il va de soi, toutefois que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

35

Exemple 1 : Sélection de peptides

- 1) La fabrication d'anticorps recombinants utilisant des méthodes de biologie moléculaire se sont largement développées depuis les dix dernières années et sont maintenant bien
5 connues de l'homme du métier. Il est aussi connu que la spécificité d'un anticorps recombinant est portée essentiellement par les CDR3 des chaînes légères et lourdes. La connaissance de l'enchaînement en acides aminés qui représente le CDR3 et de la structure du squelette des chaînes lourdes et légères d'un anticorps donné est suffisante pour que l'homme de métier puisse reproduire et reconstituer un anticorps recombinant
10 équivalent ayant les mêmes caractéristiques de reconnaissance dudit anticorps. Les séquences codant pour les parties de chaînes lourdes et légères des molécules Fab sélectionnées peuvent être isolées et synthétisées, et clonées dans tout vecteur ou réplicon permettant leur expression.
- 15 Tout système d'expression approprié peut être utilisé, par exemple bactéries, levures, cellules d'insecte, d'amphibien et de mammifère. Les systèmes d'expression dans la bactérie incluent ceux décrits dans Chang et al. (1978) Nature 275 : 615, Goeddel et al. (1979) Nature 281 : 544, Goeddel et al. (1980) Nucleic Acids Res. 8 : 4057, EP-A-36,776, US-A-4,551,433, deBoer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 21-25,
20 and Siebenlist et al. (1980) Cell 20 : 269. Les systèmes d'expression dans les levures incluent ceux décrits dans Hinnen et al. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 1929, Ito et al. (1983) J. Bacteriol. 153 : 163, Kurtz et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6 : 142, Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25 : 141, Gleeson et al. (1986) J. Gen. Microbiol. 132 : 3459, Roggenkamp et al. (1986) Mol. Gen. Genet. 202 : 302, Das et al. (1984) J.
25 Bacteriol. 158 : 1165, De Louvencourt et al. (1983) J. Bacteriol. 154 : 737, Van den Berg et al. (1990) Bio/Technology 8 : 135, Kunze et al. (1985) J. Basic Microbiol. 25 : 141, Cregg et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5 : 3376, US-A- 4,837,148 et 4,929,555, Beach et al. (1981) Nature 300 : 706, Davidow et al. (1985) Curr. Genet. 10 : 380, Gaillardin et al. (1985) Curr. Genet. 10 : 49, Ballance et al. (1983) Biochem. Biophys. Res.
30 Commun. 112 : 284-289, Tilburn et al. (1983) Gene 26 : 205-221, Yelton et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 1470-1474, Kelly et al. (1985) EMBO J. 4 : 475479 ; EP-A-244,234 et WO-A-91/00357. L'expression de gènes hétérologues dans les insectes peut être réalisée comme décrit dans US-A-4,745,051, EP-A-127,839 et EP-A-155,476, Vlak et al. (1988) J. Gen. Virol. 69 : 765-776, Miller et al. (1988) Ann. Rev.
35 Microbiol. 42 : 177, Carbonell et al. (1988) Gene 73 : 409, Maeda et al. (1985) Nature 315 : 592-594, Lebacq-Verheyden et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8 : 3129, Smith et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 8404, Miyajima et al. (1987) Gene 58 : 273, et

Martin et al. (1988) DNA 7 : 99. De nombreux souches et variants de baculovirus et cellules d'insectes permissives sont décrits dans Luckow et al. (1988) Bio/Technology 6 : 47-55, Miller et al. (1986) GENERIC ENGINEERING, Setlow, J.K. et al. Eds. Vol. 8, Plenum Publishing, pp. 277-279, and Maeda et al. (1985) Nature 315 : 592-594.

5 L'expression en cellules de mammifère peut être réalisée comme décrit dans Dijkema et al. (1985) EMBO J. 4 : 761, Gorman et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 6777, Boshart et al. (1985) Cell 41 : 521, et US-A-4,399,216. On peut aussi se reporter à Ham et al. (1979) Meth. Enz. 58 : 44, Barnes et al. (1980) Anal. Biochem. 102 : 255, US-A-4,767,704, 4,657,866 ; 4,927,762 ; 4,560,655 ; brevet US RE 30,985, WO-A-90/103430 et WO-A-87/00195.

10

Nous avons ainsi utilisé les lymphocytes du sang périphérique provenant d'un porteur sain du VHC comme matériel de départ pour produire la librairie combinatoire d'anticorps. L'ADNc des lymphocytes a été obtenu à partir de l'ARN en utilisant une

15 méthodologie développée par Sodoyer R. et al. (1997) Human Antibodies 8: 37. La librairie de chaînes lourdes et légères a été construite en utilisant les phagemides pVH (pM 831) et pVL (pM452). Les deux librairies ont été ensuite associées de façon "Random" par sous clonage des gènes VL dans la librairie de chaînes lourdes. La librairie de phagemides obtenue est ensuite infectée par le phage helper M13 VCS

20 permettant ainsi l'expression des Fab à la surface des phages. Après une première sélection des phages exprimant les Fab à leur surface par "panning" contre une portion de l'antigène de la capsid (C119) qui correspond à la portion N terminale de la capsid allant de l'acide aminé 1 à 119, ils sont soumis à un deuxième cycle de sélection contre l'antigène M48 qui correspond à la portion N terminale de la capsid

25 allant de l'acide aminé 1 à 48. 12 isolats ont été caractérisés comme reconnaissant l'antigène M48 parmi lesquels ceux exprimant l'anticorps r FabC3 et r FabC14 (voir figure 1). De plus, r FabC3 reconnaît bien l'antigène S18D qui correspond à la portion N terminale de la capsid allant de l'acide aminé 2 à 21. Par contre, r FabC14 ne reconnaît pas S18D. La séquence nucléotidique complète de ces 2 anticorps

30 recombinants a été réalisée. rFab C3 contient une chaîne lourde VH3 associée à Kappa 4 dont les CDR3 ont pour séquence respective DPLEYFDTSDYDFVDF, soit Asp-Pro-Leu-Glu-Tyr-Phe-Asp-Thr-Ser-Asp-Tyr-Asp-Phe-Val-Asp-Phe (SEQ ID NO : 10), et QQYYSTP, soit Gln-Gln-Tyr-Tyr-Ser-Thr-Pro (SEQ ID NO : 11). RFabC14 contient une chaîne lourde VH3 associée à une chaîne légère lambda1 dont les CDR3

35 ont pour séquence respective DLYYDDMSYE, soit en code à 3 lettres Asp-Leu-Tyr-Tyr-Asp-Asp-Met-Ser-Tyr-Glu (SEQ ID NO : 8), et GTWDNSLSA, soit Gly-Thr-Trp-Asp-Asn-Ser-Leu-Ser-Ala (SEQ ID NO : 9).

- 2) L'anticorps monoclonal H2, dirigé contre les protéines d'enveloppe E1 et E2 du VHC a été utilisé pour l'identification de mimotopes de l'enveloppe du VHC. Le procédé d'obtention et les caractéristiques de cet anticorps sont décrits de façon précise dans WO9729129 (Institut Pasteur). Le clone produisant l'anticorps monoclonal a été déposé le 9 février 1996 sous le numéro de dépôt CNCM I-1673 auprès de la Collection Nationale de Cultures de microorganismes de l'Institut Pasteur (CNCM) et est donc accessible au public. L'homme du métier pourra donc aisément reproduire l'invention, et notamment sélectionner les mimotopes de l'enveloppe du VHC en utilisant cet anticorps monoclonal ou reproduire un équivalent de cet anticorps en utilisant les outils classiques de la biologie moléculaire. A partir du clone, on séquence l'ADN qui code pour les immunoglobulines et notamment les fragments CDR3 de la chaîne lourdes des immunoglobulines. Connaissant la structure du squelette des chaînes lourdes et légères de l'immunoglobuline monoclonale d'une part et du CDR3 d'autre part, il est alors facile de reproduire un équivalent de l'anticorps monoclonal H2 par substitution du CDR3 d'une autre immunoglobuline par le CDR3 porté par l'anticorps monoclonal H2.
- 3) Sélection des peptides d'intérêt: les peptides, parmi lesquels ceux comprenant les séquences 1 à 7 (voir la liste de séquence ci-après) peuvent être obtenus à partir d'une librairie de peptides ou préparée par synthèse chimique classique. Une telle synthèse peut être réalisée en solution homogène ou en phase solide. En solution homogène, on procède selon la méthode décrite par Houbenweyl dans l'ouvrage "Methode der organischen Chemie" édité par E. Wunsh, vol. 15-I et II, THIEME, Stuttgart, 1974. En phase solide, on procède selon la méthode décrite par Atherton et Shepart dans leur ouvrage "Solid phase peptide synthesis", IRL Press, Oxford, 1989.

Une banque de phages exprimant des peptides random à leur surface commercialement disponible (pHD7, NEB) a été utilisée pour caractériser la structure des épitopes reconnus par les Fab solubles correspondant aux Fab exprimés à la surface des 12 isolats positifs. Les Fab solubles (sFab) sont dérivés par excision du gène III des isolats positifs. Ces sFab sont ensuite utilisés pour sensibiliser des immunotubes qui servent à la sélection, par panning, au sein de la librairie de phages exprimant les peptides random ceux qui interagissent spécifiquement avec les Fab d'intérêt. Après plusieurs cycles d'amplification et de sélection selon des procédures standard (Maniatis et al.), les phages spécifiques sélectionnés sont amplifiés dans E. Coli. Des mini préparations d'ADN phagiques sont réalisées selon les procédures décrites dans les ouvrages de Maniatis, l'ADN est séquencé à l'aide d'un séquenceur automatique à partir duquel on en déduit la

séquence du peptide exprimé par le phage. A titre d'exemple les peptides contenant les séquences Gln-Leu-Ile-Thr-Lys-Pro-Leu, His-Ala-Phe-Pro-His-Leu-His et Ser-Ala-Pro-Ser-Ser-Lys-Asn ont été isolés en utilisant les anticorps recombinants FabC3 et FabC14. Ces peptides sont capables d'inhiber totalement l'interaction de l'anticorps FabC3 et FabC14 avec l'antigène M48 alors qu'ils n'ont pas cet effet inhibiteur vis à vis d'un anticorps monoclonal 2C6F6 qui reconnaît un épitope linéaire situé entre les acides aminés 18 et 24 de l'antigène M48 (figs 2 à 4). De même, les peptides contenant les séquences Gly-Glu-Thr-Arg-Ala-Pro-Leu, Ser-Val-Ser-Val-Gly-Met-Lys-Pro-Ser-Pro-Arg-Pro, Trp-Gln-Ser-Tyr-Pro-Met-Phe-Asn-Asn-Thr-Leu-Thr et Met-Leu-Pro-Ser-Val-Leu-Asp ont été isolés en utilisant l'anticorps monoclonal H2. Ces mêmes séquences sont reconnues également par d'autres anticorps monoclonaux spécifiques de l'enveloppe du VHC.

Exemple 2 : Formulations vaccinales

Un peptide selon l'exemple 1 est produit par synthèse chimique ("Methode der organischen Chemie" édité par E. Wunsh, vol. 15-I et II, THIEME, Stuttgart, 1974 ; Atherton et Shepart dans leur ouvrage "Solid phase peptide synthesis", IRL Press, Oxford, 1989) ou obtenu à partir du produit d'expression d'un vecteur recombinant et notamment d'un baculovirus recombinant en utilisant les techniques développées par Smith et al USA 4,745,051. Des émulsions eau dans huile sont ensuite préparées en utilisant le squalène comme constituant de la phase organique, le Tween 80 ou un mélange de Tween 80 et de SPAN comme surfactant, la phase aqueuse contenant la solution de peptide. Lorsque l'hydrophobicité du peptide est très importante, on procède à la réalisation d'émulsions huile dans eau dans lesquelles le peptide sera associé à la phase organique. Au besoin des immunostimulants comme le QS 21, des dérivés du MPL ou tout autre adjuvant sont incorporés dans la préparation de ces émulsions.

Exemple 3 : Formulations vaccinales

On prépare une formulation vaccinale à base de liposomes contenant un peptide selon l'exemple 1 en se référant aux ouvrages tels que " Liposomes as Drug Carriers " édité par G. Gregoriadis, 1988, ou aux volumes 1 à 3 de "Liposome Technology édité par G. Gregoriadis, 1984.

Exemple 4 : Formulations vaccinales

On prépare une formulation vaccinale à base d'ISCOMs contenant un peptide selon l'exemple 1 en se référant aux articles de référence de B Morein et al, 1984, Nature 308:457
5 ou Immunology toDay, 1987, 8(11) : 333.

Exemple 5 : Formulations vaccinales

On prépare une formulation vaccinale à base de micro particules comprenant un peptide
10 selon l'exemple 1 mimant un épitope conformationnel d'antigène de structure du VHC. Pour la préparation de micro particules ou de nanoparticules, de nombreux polymères synthétiques ou naturels sont utilisés comme le polymère de methyl métacrylate (Troster S.D. et al, 1992, J. Micro-encaps. 9:19) mais souvent le poly (d, l-lactide- co-glycolide) encore appelé PLGA est le référent du fait de sa biodégradabilité, de son innocuité et de ses
15 applications déjà anciennes dans le domaine médical. Les micro particules de PLGA chargées en peptides sont préparées notamment par double émulsion eau dans huile dans eau. Le peptide est solubilisé en phase aqueuse puis émulsionné dans une solution de PLGA en phase organique comme le dichlorométhane. L'émulsion eau dans huile est obtenue par agitation à haute vitesse de la solution de peptide dans la solution organique de PLGA. Puis
20 une seconde phase aqueuse contenant une concentration appropriée de surfactant tel que l'alcool polyvinylique est ajoutée à la première émulsion pour réaliser ainsi la double émulsion. D'autres surfactants sont également utilisés comme les sels biliaires ou le poly (oxyéthylène glycérol monoleate) pour stabiliser la double émulsion (Rafati H et al., 1997, Vaccine 15 : 1888). Après agitation pendant une nuit pour permettre l'évaporation du
25 solvant, les micro particules de PLGA sont lavées plusieurs fois dans l'eau distillée puis lyophilisée et gardées à 5°C.

Exemple 6 : Composition vaccinale

30 Les peptides qui comportent moins de 20 acides aminés peuvent être faiblement immunogéniques. Pour augmenter l'immunogénicité des peptides selon l'exemple 1, on prépare une formulation vaccinale à base de polymères du même peptide ou de peptides différents, sous forme d'octamères comprenant une structure poly-lysine ramifiée à 8 bras latéraux sur lesquels sont fixés le même peptide ou des peptides différents selon l'exemple 1
35 en mettant en œuvre le procédé développé par Posnett D.N et al. (1988) J. Biol. Chem. 263 : 1719.

Exemple 7 : Composition vaccinale

On prépare une formulation vaccinale comprenant un peptide selon l'exemple 1 couplé à une molécule porteuse comme l'anatoxine tétanique ou diphtérique en utilisant des procédés bien connus de l'homme de métier. Néanmoins, pour conserver au mieux la conformation du site antigénique porté par le peptide l'usage de "bras espaceurs" est recommandé de même qu'il faut éviter autant que possible le recours au glutaraldehyde comme agent de conjugaison.

Exemple 8 : Composition vaccinale comprenant un lipopeptide

On prépare une formulation vaccinale comprenant un peptide selon l'exemple 1 couplé à une ou plusieurs chaînes dérivés d'acides gras parmi lesquels la Nε palmitoyl-lysine, la N,N-dipalmitoyl-lysine, le pimélaute, le trimexaute ou à un groupement stéroïdique parmi lesquels le Nε[(cholest-5-ényl-3-oxy)-acétyl]-lysine ou l'acide (cholest-5-ényl-3-oxy) acétique selon le procédé décrit dans le brevet EP0491628 (INSERM) de façon à obtenir un lipopeptide.

Exemple 9 : Expression des peptides par des poxvirus

On prépare une composition vaccinale comprenant un poxvirus recombinant codant pour un peptide selon l'exemple 1 mimant un épitope conformationnel d'antigène de structure du VHC. Les poxvirus recombinants sont obtenus par recombinaison homologue, par exemple, en utilisant des cassettes d'expression (plasmide) contenant le poly nucléotide qui code pour le peptide d'intérêt sous la dépendance de promoteurs des poxvirus (H6, I3L) selon les procédés décrits dans US 5,863,542.

Exemple 10 : Combinaison de peptides

On prépare une composition vaccinale comprenant plusieurs peptides selon l'exemple 1 en utilisant les mêmes modes de préparations développés dans les exemples 1 à 8, peptides qui peuvent être sous forme de conjugués ou non, comprenant ou non les séquences 1 à 7 citées dans la liste des séquences. On prépare notamment une composition vaccinale comprenant à la fois un ou des peptides mimant un ou des épitopes conformationnels de la nucléocapside et un ou des peptides mimant un ou des épitopes conformationnels de l'enveloppe du VHC

Exemple 11 : Expression de plusieurs peptides par un poxvirus

On prépare une composition vaccinale comprenant un poxvirus recombinant codant pour plusieurs peptides selon l'exemple 1. L'utilisation et la préparation de vecteurs recombinants
5 codant pour plusieurs épitopes est bien connu de l'homme de métier (Toes RE et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 14660 , Thomson SA et al. (1996) J. Immunol. 157: 822) et est applicable aussi à la préparation de poxvirus recombinants codant pour des mimotopes multiples. On prépare notamment une composition vaccinale comprenant un canaripox recombinant (ALVAC recombinant) codant pour des mimotopes multiples de la
10 nucléocapside et de l'enveloppe du VHC.

Exemple 13 : Diagnostic

On met en œuvre une détection d'anticorps spécifiques du VHC par ELISA en utilisant un
15 ou plusieurs peptides selon l'exemple 1 pour le diagnostic de l'hépatite C à partir d'un échantillon biologique. Pour cela, on prélève un échantillon de fluide physiologique (sang, plasma, sérum), échantillon que l'on fait ensuite réagir en présence d'un peptide selon l'invention. On utilise le peptide lui-même comme réactif de diagnostic. On recourt généralement
20 -soit à un test de diagnostic indirect, de type ELISA dans lequel le peptide fixé sur un support (puits) est mis en présence de l'échantillon à tester, tandis que la révélation de la fixation antigène-anticorps est assurée par un anti-Ig marqué.
-soit à un test par compétition ou de déplacement, dans lequel on utilise un peptide selon l'exemple 1, et un anticorps marqué spécifique du peptide. Le peptide est là aussi fixé à un
25 support solide. Dans le test de compétition, on met le peptide fixé à son support simultanément en présence de l'échantillon (anticorps de l'échantillon) et d'un anticorps marqué spécifique du peptide. On utilise comme anticorps marqués des anticorps couplés à la peroxydase. Dans le test de compétition ou de déplacement on utilise également des anticorps monoclonaux et polyclonaux ou anticorps recombinants spécifiques du peptide
30 selon l'exemple 1, qui sont parfois sous forme de fragments Fab ou F(ab')₂.

Exemple 13 : Diagnostic

On met en œuvre une détection d'anticorps spécifiques du VHC par
35 immunochromatographie en utilisant un ou plusieurs peptides selon l'invention pour le diagnostic de l'hépatite C à partir d'un échantillon biologique

Pour cela, le peptide selon l'exemple 1 est fixé sur un support de type bandelette et on se réfère à l'article de Robert F.N Zurk et al., Clin. Chem. 31/7, 1144-1150 (1985) ainsi qu'aux brevets ou demandes de brevet WO-A-88/08 534, WO-A-91/12528, EP-A-291 176, EP-A-299 428, EP-A-291 194, EP-A-284 232, US-A-5 120 643, US-A-5 030 558, US-A-5 266 497, US-A-4 740 468, US-A-5 266 497, US-A-4 855 240, US-A-5 451 504, US-A-5 141 850, US-A-5 232 835 et US-A-5 238 652 pour mettre en œuvre le procédé.

Exemple 14 : Diagnostic

- 10 On met en œuvre une étude de la réponse lymphoproliférative spécifique à un ou plusieurs peptides selon l'exemple 1 pour le diagnostic de l'hépatite C à partir d'un échantillon biologique. Le sang du patient est recueilli sur tube hépariné. Les lymphocytes sont ensuite séparés par centrifugation sur Ficoll hypaque puis distribués en micro plaques 96 puits stériles à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules par puits à fond rond sous un volume final de 200µl de milieu de culture complet (RPMI 1640 supplémenté par 25mM HEPES, 2mM L-glutamine , 50U/ml de pénicilline, 50µg/ml de streptomycine et 5% de sérum AB décomplémenté) et mis en présence de concentrations variables du peptide conforme à l'invention (concentrations allant de 1ng/ml à 50µg/ml). Chaque concentration de peptide est testée en trip liqueur pour s'affranchir au mieux des variations biologiques. Des combinaisons multiples de peptides peuvent être également testées dans la gamme de concentration indiquée, par exemple une combinaison résultant de l'association d'un mimotope de l'enveloppe avec un mimotope de la nucléocapside dans la gamme de concentration indiquée. Après 5 jours de culture à 37 °c sous 5% CO₂, 0,5µci de thymidine tritiée est ajouté à chaque puits. Après une nouvelle incubation de 16 heures, on recueille l'ADN cellulaire de chaque puits de culture sur des filtres après précipitation à l'éthanol et on mesure le taux d'incorporation de thymidine tritiée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide qui reflète l'intensité de la réponse lymphoproliférative. Les résultats sont exprimés sous la forme d'index de stimulation (moyenne des cpm des puits de culture lymphocytaire contenant une concentration donnée en peptide/ moyenne des cpm des puits de culture lymphocytaire sans peptide). La réponse lymphoproliférative est considérée comme positive lorsque l'index de stimulation est supérieur à 3.

Revendications

- 1) Peptide pour le traitement thérapeutique ou prophylactique de l'hépatite C, capable de réagir avec un anticorps spécifique d'un antigène de structure du virus de l'hépatite C, comprenant une séquence en acides aminés qui mime un épitope conformationnel d'un antigène de structure dudit virus sans toutefois correspondre à une séquence continue d'acides aminés de cet antigène, caractérisé en ce que ce peptide comprend notamment au choix les séquences 1 à 7
- | | | |
|----|---------------|---|
| 10 | SEQ ID NO : 1 | Gln-Leu-Ile-Thr-Lys-Pro-Leu |
| | SEQ ID NO : 2 | His-Ala-Phe-Pro-His-Leu-His |
| | SEQ ID NO : 3 | Ser-Ala-Pro-Ser-Ser-Lys-Asn |
| | SEQ ID NO : 4 | Gly-Glu-Thr-Arg-Ala-Pro-Leu |
| | SEQ ID NO : 5 | Ser-Val-Ser-Val-Gly-Met-Lys-Pro-Ser-Pro-Arg-Pro |
| 15 | SEQ ID NO : 6 | Trp-Gln-Ser-Tyr-Pro-Met-Phe-Asn-Asn-Thr-Leu-Thr |
| | SEQ ID NO : 7 | Met-Leu-Pro-Ser-Val-Leu-Asp. |
- 2) Peptide selon la revendication 1, pour laquelle l'antigène de structure est représenté par la capsid ou l'enveloppe du virus de l'hépatite C.
- 3) Peptide selon la revendication 2, pour laquelle l'anticorps spécifique est dirigé contre la capsid et comprend au niveau de la région hyper variable CDR3 de la chaîne lourde VH3 la séquence polypeptidique Asp-leu-Tyr-Tyr-Asp-Asp-Met-Ser-Tyr-Glu et au niveau de la région hyper variable CDR3 de la chaîne légère Vlambda1 la séquence Gly-Thr-Trp-Asp-Asn-Ser-Leu-Ser-Ala
- 4) Peptide selon la revendication 2, pour laquelle l'anticorps spécifique est dirigé contre la capsid et comprend au niveau de la région hyper variable CDR3 de la chaîne lourde VH3 la séquence polypeptidique Asp-Pro-Leu-Glu-Tyr-Phe-Asp-Thr-Ser-Asp-Tyr-Asp-Phe-Val-Asp-Phe et au niveau de la région hyper variable CDR3 de la chaîne légère V kappa4 la séquence Gln-Gln-Tyr-Tyr-Ser-Thr-Pro
- 5) Peptide comprenant l'enchaînement et/ou la répétition d'un ou plusieurs peptides selon l'une des revendications 1 à 4.

- 6) Conjugué comprenant au moins un peptide selon l'une des revendications 1 à 4 lié à une molécule pour induire ou renforcer l'immunogénicité dudit peptide.
- 5 7) Vecteur recombinant comprenant une cassette d'expression fonctionnelle permettant l'expression d'un poly nucléotide codant pour un peptide selon l'une des revendications 1 à 5.
- 10 8) Vecteur recombinant selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il est un adénovirus, un poxvirus, un baculovirus, un phage ou un plasmide.
- 15 9) Composition thérapeutique ou prophylactique de l'hépatite C, notamment destiné à un usage vaccinal, dont le principe actif comprend un peptide selon l'une des revendications 1 à 5, le cas échéant conjugué selon la revendication 6, et /ou un vecteur recombinant codant pour ledit peptide selon l'une des revendications 7 et 8.
- 20 10) Composition selon la revendication 9 dont le principe actif est sous la forme d'une formulation associée à un adjuvant compatible permettant l'administration d'une dose efficace par voie muqueuse ou parentérale.
- 25 11) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 5 en tant que réactif pour le diagnostic de l'hépatite C et/ou de la susceptibilité à la chronicité en cas d'infection établie par le virus de l'hépatite C, ledit diagnostic comprenant l'évaluation, à partir d'un échantillon de sang, de la réponse humorale et/ou à médiation cellulaire spécifique de ce peptide.
- 30 12) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 5 en tant que réactif pour le diagnostic de l'hépatite C et/ou de la susceptibilité à la chronicité en cas d'infection établie par le virus de l'hépatite C, ledit diagnostic comprenant l'évaluation de la réponse d'hypersensibilité retardée consécutive à l'administration intradermique ou sous cutanée de ce peptide.
- 35 13) Utilisation d'un peptide selon l'une des revendications 1 à 5, le cas échéant d'un conjugué selon la revendication 6 et/ou d'un vecteur recombinant selon l'une des

revendications 7 et 8 pour la préparation d'une composition thérapeutique ou prophylactique telle que celle revendiquée à la revendication 9, destinée au traitement ou à la prévention de l'hépatite C.

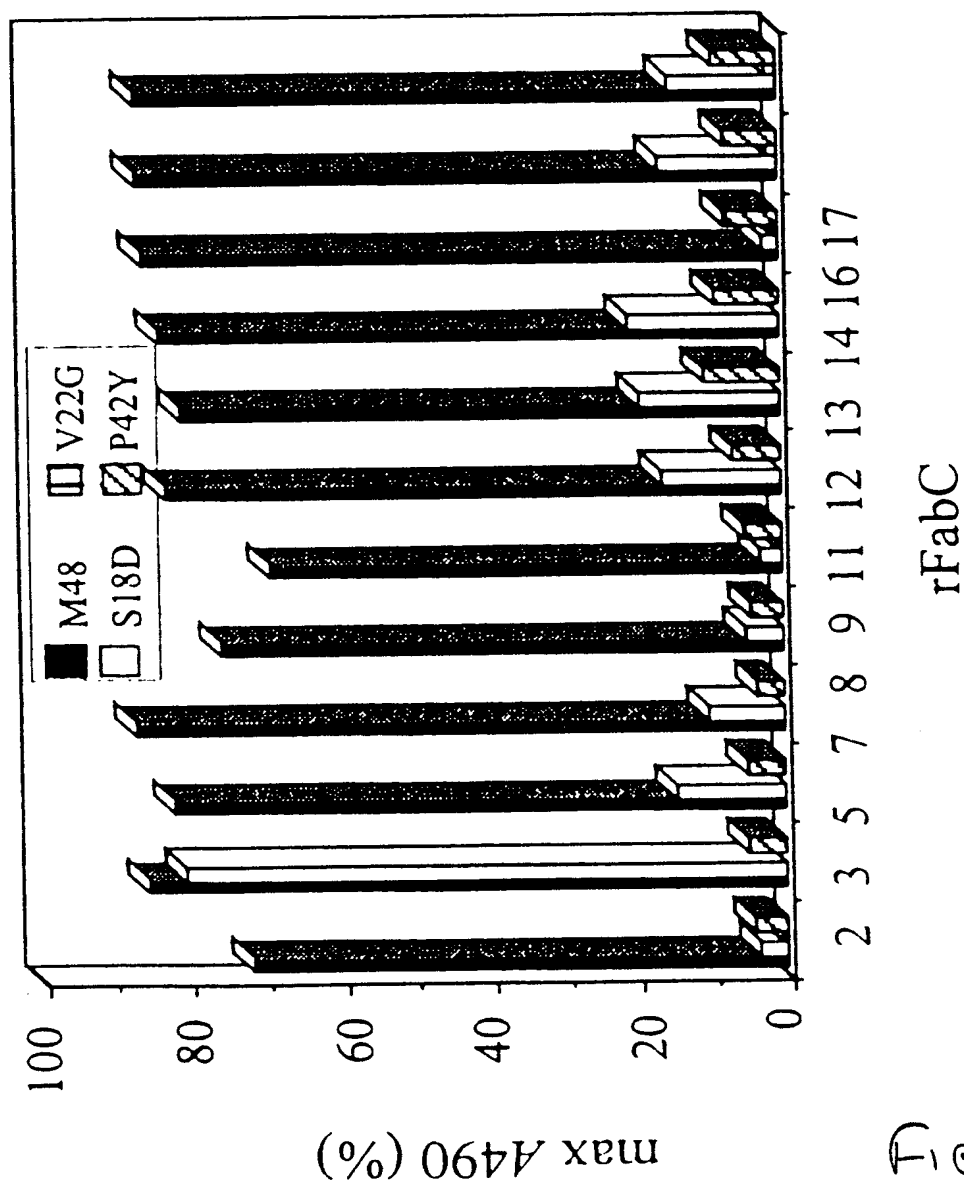


Fig 1

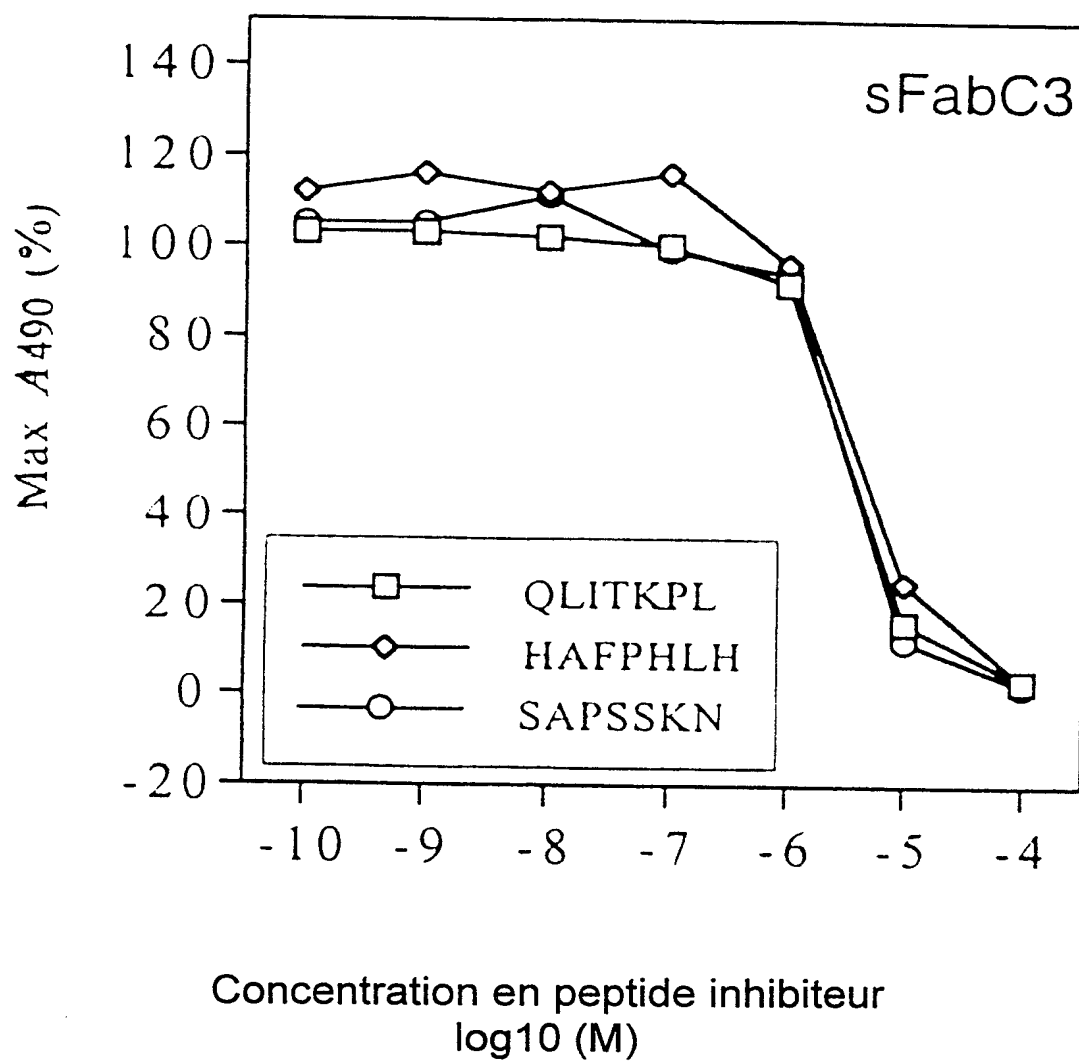


FIG 2

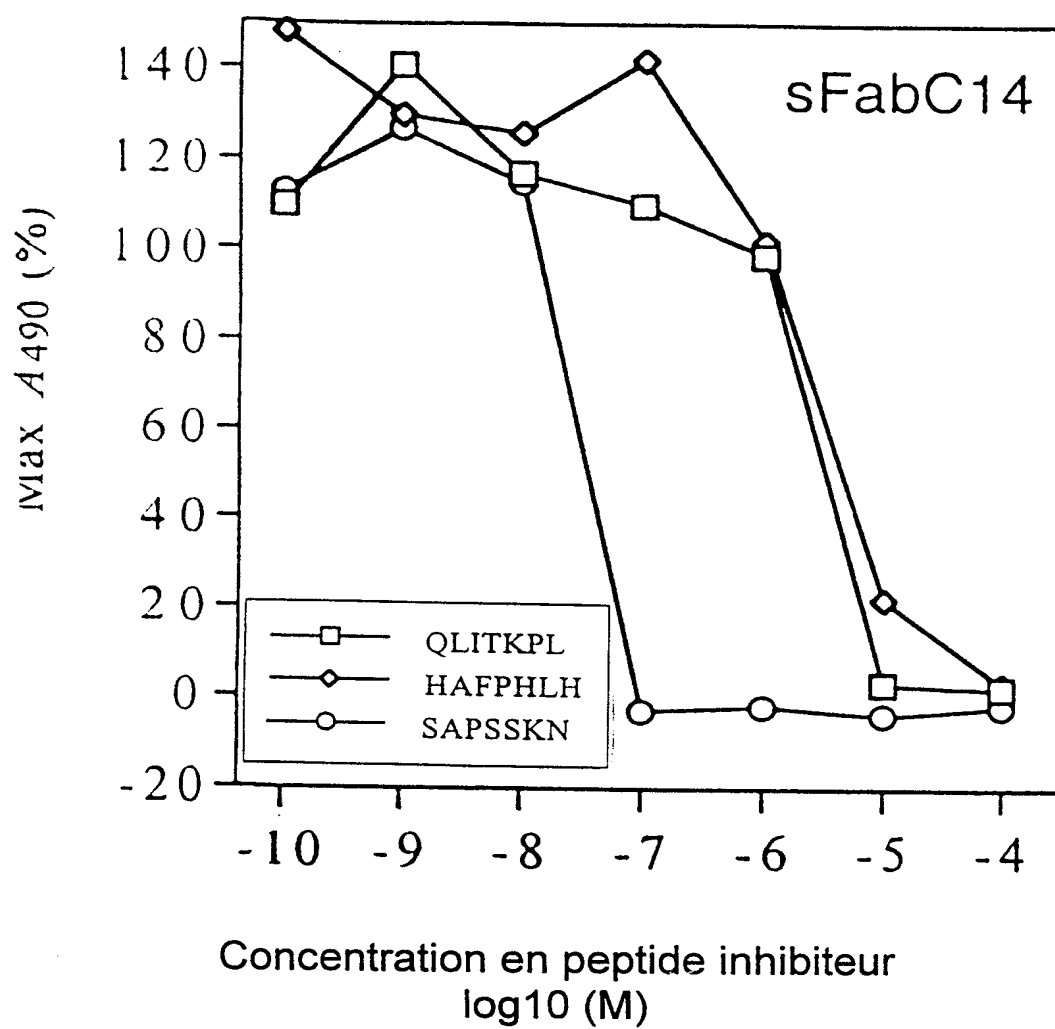


FIG 3

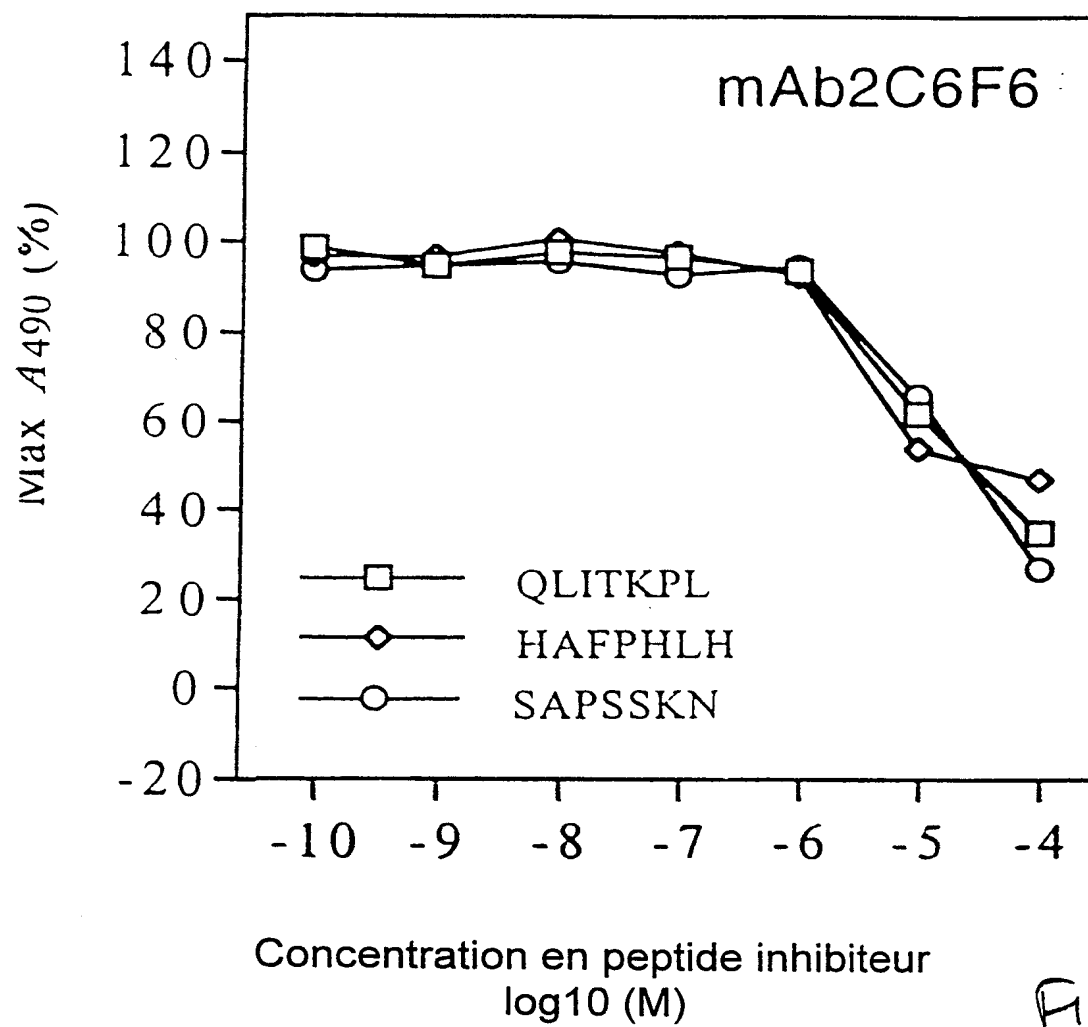


FIG 4

LISTE DE SEQUENCES

- 5 <110> Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins
<120> Mimotopes du VHC
<130> 9803
<140>
<141>
<150> FR9806335
<151> 1998-05-14
10 <160> 11
<170> PatentIn Ver. 2.1
- 15 <210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
20 <221> PEPTIDE
<222> ()
<223> Description de la séquence artificielle: mimotope
du VHC
<300>
25 <400> 1
Gln Leu Ile Thr Lys Pro Leu
1 5
- 30 <210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
35 <220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
<223> mimotopes du HCV
<220>
40 <223> Description de la séquence artificielle: mimotope
du VHC
<400> 2
His Ala Phe Pro His Leu His
1 5
45
- 50 <210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
55 <223> mimotopes du HCV
<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mimotope
du VHC
<400> 3
60 Ser Ala Pro Ser Ser Lys Asn
1 5
<210> 4

5 <211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
<223> mimotopes du HCV
<220>
10 <223> Description de la séquence artificielle: mimotope
du VHC
<400> 4
Gly Glu Thr Arg Ala Pro Leu
1 5
15
20 <210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> PEPTIDE
25 <222> (1)..(12)
<223> mimotopes du VHC
<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mimotope
du VHC
30 <400> 5
Ser Val Ser Val Gly Met Lys Pro Ser Pro Arg Pro
1 5 10
35
40 <210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(12)
<223> mimotopes du VHC
45 <220>
<223> Description de la séquence artificielle: mimotope
du VHC
<400> 6
50 Trp Gln Ser Tyr Pro Met Phe Asn Asn Thr Leu Thr
1 5 10
55 <210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Séquence artificielle
<220>
60 <221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
<223> mimotope du VHC

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: mimotope
du VHC
<400> 7
5 Met Leu Pro Ser Val Leu Asp
1 5

10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
15 <213> Hydnophora rigida
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> CDR3 de l'anticorps rFabC14
20 <400> 8
Asp Leu Tyr Tyr Asp Asp Met Ser Tyr Glu
1 5 10

25

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Hydnophora rigida
30 <220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(9)
<223> CDR3 de l'anticorps rFabC14
<400> 9
35 Gly Thr Trp Asp Asn Ser Leu Ser Ala
1 5

40

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> Hydnophora rigida
<220>
<221> PEPTIDE
45 <222> (1)..(16)
<223> CDR3 de l'anticorps rFabC3
<400> 10
Asp Pro Leu Glu Tyr Phe Asp Thr Ser Asp Tyr Asp Phe Val Asp Phe
1 5 10 15

50

<210> 11
<211> 7
55 <212> PRT
<213> Hydnophora rigida
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(7)
60 <223> CDR3 de l'anticorps rFabC3
<400> 11
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. onal Application No
PCT/FR 99/01155

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/18 C12N15/51 C12N15/63 C07K16/10 A61K39/29
A61K39/42 G01N33/576

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 21922 A (ABBOT LABORATORIES) 17 August 1995 (1995-08-17) voir SEQ.ID.N. 385, pages 400-414 ---	1
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9725 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 97-275446 XP002111270 -& JP 09 098788 A (SRL KK), 15 April 1997 (1997-04-15) page 10 see last protein sequence. ---	1
X	WO 93 14116 A (GENELABS TECH INC ;US HEALTH (US)) 22 July 1993 (1993-07-22) voir SEQ.ID.N.38 figure 11 ---	1
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 August 1999

Date of mailing of the international search report

17/08/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 99/01155

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 19162 A (NOVALON PHARMACEUTICAL CORP (US)) 7 May 1998 (1998-05-07) see SEQ.ID.N.110 ---	1
X	WO 95 12677 A (INNOGENETICS NV (BE)) 11 May 1995 (1995-05-11) abstract page 5, paragraph 2 page 10, last paragraph - page 19, paragraph 3 ---	1,2,5,6, 9
Y	WO 97 29129 A (PASTEUR INSTITUT (FR)) 14 August 1997 (1997-08-14) cited in the application page 1, line 1 - page 5, line 2; examples 1-3 ---	1,2,7-11
Y	CHAN S-W ET AL: "HUMAN RECOMBINANT ANTIBODIES SPECIFIC FOR HEPATITIS C VIRUS CORE AND ENVELOPE E2 PEPTIDES FROM AN IMMUNE PHAGE DISPLAY LIBRARY" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 77, June 1996 (1996-06), pages 2531-2539, XP002084943 cited in the application the whole document ---	1,2,7-11
Y	WO 97 44469 A (CHIRON CORP) 27 November 1997 (1997-11-27) abstract; figures 1-3 page 16-18 ---	1,2,7-11
A	EP 0 754 704 A (INNOGENETICS NV) 22 January 1997 (1997-01-22) abstract page 2, line 45 - page 3, line 54 ---	1,2,7-11
A	EP 0 569 309 A (BIO MERIEUX) 10 November 1993 (1993-11-10) abstract page 7, line 1-20 page 11, line 1-35 page 14, line 25 - page 15, line 25 ---	1,2
A	EP 0 770 679 A (BEHRINGWERKE AG) 2 May 1997 (1997-05-02) abstract page 6, line 49 - page 8, line 57 ---	1,2,7-11
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 99/01155

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NASOFF M S ET AL: "IDENTIFICATION OF AN IMMUNODOMINANT EPITOPE WITHIN THE CAPSID PROTEIN OF HEPATITIS C VIRUS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, no. 12, 15 June 1991 (1991-06-15), pages 5462-5466, XP000310531 the whole document figure 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2
A	<p>HOSEIN B ET AL: "IMPROVED SERODIAGNOSIS OF HEPATITIS C VIRUS INFECTION WITH SYNTHETIC PEPTIDE ANTIGEN FROM CAPSID PROTEIN" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, no. 9, 1 May 1991 (1991-05-01), pages 3647-3651, XP000203186 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,11
A	<p>CHIEN D Y ET AL: "DIAGNOSIS OF HEPATITIS C VIRUS (HCV) INFECTION USING AN IMMUNODOMINANT CHIMERIC POLYPROTEIN TO CAPTURE CIRCULATING ANTIBODIES: REEVALUATION OF THE ROLE OF HCV IN LIVER DISEASE" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 89, November 1992 (1992-11), pages 10011-10015, XP002044416 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,11
A	<p>CERINO A ET AL: "A HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR THE N TERMINUS OF THE HEPATITIS C VIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 12, 15 December 1993 (1993-12-15), pages 7005-7015, XP002048542 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	11
A	<p>BUKH J ET AL: "GENETIC HETEROGENEITY OF HEPATITIS C VIRUS: QUASISPECIES AND GENOTYPES" SEMINARS IN LIVER DISEASE, vol. 15, no. 1, February 1995 (1995-02), pages 41-63, XP000615891 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/01155

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DELMASTRO P ET AL: "Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration" VACCINE, vol. 15, no. 11, 1 August 1997 (1997-08-01), page 1276-1285 XP004086601 ISSN: 0264-410X the whole document</p> <p>----</p>	1,2,7-10
A	<p>PREZZI C ET AL., : "Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, 1996, pages 4504-4513, XP002111267 the whole document</p> <p>----</p>	1,2,7-11
A	<p>MECCHIA M ET AL., : "Nonrheumatoid IgM in human hepatitis C virus-associated type II cryoglobulinemia recognize mimotopes of the CD4-like LAG-3 protein" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 157, 1996, pages 3727-3736, XP002111269 the whole document</p> <p>----</p>	1-4,7,9,10
A	<p>PLOEG VAN DER J R ET AL: "IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF MULTIPLE REPEATS OF A LINEAR EPITOPE OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 GLYCOPROTEIN D" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 124, 1989, pages 211-217, XP002044417 the whole document</p> <p>----</p>	1,5
A	<p>WANG J -G ET AL: "HEPATITIS DELTA VIRUS ANTIGEN FORMS DIMERS AND MULTIMERIC COMPLEXES IN VIVO" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 1, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 446-454, XP000572273 ISSN: 0022-538X the whole document</p> <p>----</p>	1,5
P,A	<p>PUNTORIERO G ET AL.,: "Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants" THE EMBO JOURNAL, vol. 17, no. 13, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 3521-3533, XP002111268 the whole document</p> <p>-----</p>	1,2,7-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter national Application No

PCT/FR 99/01155

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9521922 A	17-08-1995	CA 2166313 A EP 0745129 A JP 10337193 A JP 9511137 T US 5843450 A WO 9829747 A	17-08-1995 04-12-1996 22-12-1998 11-11-1997 01-12-1998 09-07-1998
JP 9098788 A	15-04-1997	NONE	
WO 9314116 A	22-07-1993	US 5885768 A CA 2125700 A CA 2125701 A EP 0628053 A EP 0623169 A JP 8509692 T JP 8509201 T WO 9314208 A US 5686239 A US 5741490 A US 5770689 A	23-03-1999 22-07-1993 22-07-1993 14-12-1994 09-11-1994 15-10-1996 01-10-1996 22-07-1993 11-11-1997 21-04-1998 23-06-1999
WO 9819162 A	07-05-1998	AU 5426898 A	22-05-1998
WO 9512677 A	11-05-1995	AU 698878 B AU 7993294 A CA 2175692 A EP 0725824 A	12-11-1998 23-05-1995 11-05-1995 14-08-1996
WO 9729129 A	14-08-1997	FR 2744725 A AU 1728397 A	14-08-1997 28-08-1997
WO 9744469 A	27-11-1997	AU 3214397 A CA 2250723 A	09-12-1997 27-11-1997
EP 0754704 A	22-01-1997	EP 0489968 A SG 47062 A AT 144993 T AU 652013 B AU 9068991 A CA 2074370 A CY 2043 A CY 2053 A DE 69029092 D DE 69029092 T DK 489968 T WO 9210514 A EP 0644202 A ES 2095852 T GR 3022089 T GR 3023664 T HK 57597 A HU 65930 A IL 100158 A JP 5503722 T US 5910404 A AT 149522 T DE 69030124 D DE 69030124 T	17-06-1992 20-03-1998 15-11-1996 11-08-1994 08-07-1992 15-06-1992 20-02-1998 30-04-1998 12-12-1996 17-04-1997 24-03-1997 25-06-1992 22-03-1995 01-03-1997 31-03-1997 30-09-1997 09-05-1997 28-07-1994 22-02-1998 17-06-1998 08-06-1999 15-03-1997 10-04-1997 18-09-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/01155

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0754704 A		DK 644202 T	15-09-1992
		ES 2101388 T	01-07-1997
EP 0569309 A	10-11-1993	FR 2690921 A	12-11-1993
		CA 2095693 A	07-11-1993
EP 0770679 A	02-05-1997	DE 4034982 A	07-05-1992
		DE 4112743 A	22-10-1992
		DE 4120281 A	24-12-1992
		DE 4121431 A	07-01-1993
		AU 657497 B	16-03-1995
		AU 8700291 A	07-05-1992
		CA 2054798 A	04-05-1992
		EP 0484787 A	13-05-1992
		JP 4330098 A	18-11-1992

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Derr > Internationale No

PCT/FR 99/01155

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 C07K14/18 C12N15/51 C12N15/63 C07K16/10 A61K39/29
A61K39/42 G01N33/576

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 95 21922 A (ABBOT LABORATORIES) 17 août 1995 (1995-08-17) voir SEQ.ID.N. 385, pages 400-414 ---	1
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9725 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 97-275446 XP002111270 -& JP 09 098788 A (SRL KK), 15 avril 1997 (1997-04-15) page 10 see last protein sequence. ---	1
X	WO 93 14116 A (GENELABS TECH INC ;US HEALTH (US)) 22 juillet 1993 (1993-07-22) voir SEQ.ID.N.38 figure 11 --- -/--	1

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 août 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/08/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mateo Rosell, A.M.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Derr : Internationale No

PCT/FR 99/01155

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 19162 A (NOVALON PHARMACEUTICAL CORP (US)) 7 mai 1998 (1998-05-07) see SEQ.ID.N.110 ---	1
X	WO 95 12677 A (INNOGENETICS NV (BE)) 11 mai 1995 (1995-05-11) abrégé page 5, alinéa 2 page 10, dernier alinéa - page 19, alinéa 3 ---	1,2,5,6, 9
Y	WO 97 29129 A (PASTEUR INSTITUT (FR)) 14 août 1997 (1997-08-14) cité dans la demande page 1, ligne 1 - page 5, ligne 2; exemples 1-3 ---	1,2,7-11
Y	CHAN S-W ET AL: "HUMAN RECOMBINANT ANTIBODIES SPECIFIC FOR HEPATITIS C VIRUS CORE AND ENVELOPE E2 PEPTIDES FROM AN IMMUNE PHAGE DISPLAY LIBRARY" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 77, juin 1996 (1996-06), pages 2531-2539, XP002084943 cité dans la demande le document en entier ---	1,2,7-11
Y	WO 97 44469 A (CHIRON CORP) 27 novembre 1997 (1997-11-27) abrégé; figures 1-3 page 16-18 ---	1,2,7-11
A	EP 0 754 704 A (INNOGENETICS NV) 22 janvier 1997 (1997-01-22) abrégé page 2, ligne 45 - page 3, ligne 54 ---	1,2,7-11
A	EP 0 569 309 A (BIO MERIEUX) 10 novembre 1993 (1993-11-10) abrégé page 7, ligne 1-20 page 11, ligne 1-35 page 14, ligne 25 - page 15, ligne 25 ---	1,2
A	EP 0 770 679 A (BEHRINGWERKE AG) 2 mai 1997 (1997-05-02) abrégé page 6, ligne 49 - page 8, ligne 57 ---	1,2,7-11
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De l'Organisation Internationale No

PCT/FR 99/01155

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>NASOFF M S ET AL: "IDENTIFICATION OF AN IMMUNODOMINANT EPITOPE WITHIN THE CAPSID PROTEIN OF HEPATITIS C VIRUS"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, no. 12, 15 juin 1991 (1991-06-15), pages 5462-5466, XP000310531 le document en entier figure 1</p> <p>---</p>	1,2
A	<p>HOSEIN B ET AL: "IMPROVED SERODIAGNOSIS OF HEPATITIS C VIRUS INFECTION WITH SYNTHETIC PEPTIDE ANTIGEN FROM CAPSID PROTEIN"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, no. 9, 1 mai 1991 (1991-05-01), pages 3647-3651, XP000203186 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	1,2,11
A	<p>CHIEN D Y ET AL: "DIAGNOSIS OF HEPATITIS C VIRUS (HCV) INFECTION USING AN IMMUNODOMINANT CHIMERIC POLYPROTEIN TO CAPTURE CIRCULATING ANTIBODIES: REEVALUATION OF THE ROLE OF HCV IN LIVER DISEASE"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 89, novembre 1992 (1992-11), pages 10011-10015, XP002044416 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	1,2,11
A	<p>CERINO A ET AL: "A HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR THE N TERMINUS OF THE HEPATITIS C VIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 151, no. 12, 15 décembre 1993 (1993-12-15), pages 7005-7015, XP002048542 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	11
A	<p>BUKH J ET AL: "GENETIC HETEROGENEITY OF HEPATITIS C VIRUS: QUASISPECIES AND GENOTYPES"</p> <p>SEMINARS IN LIVER DISEASE, vol. 15, no. 1, février 1995 (1995-02), pages 41-63, XP000615891 cité dans la demande le document en entier</p> <p>---</p>	1,2

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: le Internationale No

PCT/FR 99/01155

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DELMASTRO P ET AL: "Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration" VACCINE, vol. 15, no. 11, 1 août 1997 (1997-08-01), page 1276-1285 XP004086601 ISSN: 0264-410X le document en entier</p>	1,2,7-10
A	<p>PREZZI C ET AL., : "Selection of antigenic and immunogenic mimics of hepatitis C virus using sera from patients" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 156, 1996, pages 4504-4513, XP002111267 le document en entier</p>	1,2,7-11
A	<p>MECCHIA M ET AL., : "Nonrheumatoid IgM in human hepatitis C virus-associated type II cryoglobulinemia recognize mimotopes of the CD4-like LAG-3 protein" THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 157, 1996, pages 3727-3736, XP002111269 le document en entier</p>	1-4,7,9,10
A	<p>PLOEG VAN DER J R ET AL: "IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF MULTIPLE REPEATS OF A LINEAR EPITOPE OF HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 1 GLYCOPROTEIN D" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 124, 1989, pages 211-217, XP002044417 le document en entier</p>	1,5
A	<p>WANG J -G ET AL: "HEPATITIS DELTA VIRUS ANTIGEN FORMS DIMERS AND MULTIMERIC COMPLEXES IN VIVO" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 67, no. 1, 1 janvier 1993 (1993-01-01), pages 446-454, XP000572273 ISSN: 0022-538X le document en entier</p>	1,5
P,A	<p>PUNTORIERO G ET AL.,: "Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants" THE EMBO JOURNAL, vol. 17, no. 13, 1 juillet 1998 (1998-07-01), pages 3521-3533, XP002111268 le document en entier</p>	1,2,7-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De Je Internationale No

PCT/FR 99/01155

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9521922 A	17-08-1995	CA 2166313 A EP 0745129 A JP 10337193 A JP 9511137 T US 5843450 A WO 9829747 A	17-08-1995 04-12-1996 22-12-1998 11-11-1997 01-12-1998 09-07-1998
JP 9098788 A	15-04-1997	AUCUN	
WO 9314116 A	22-07-1993	US 5885768 A CA 2125700 A CA 2125701 A EP 0628053 A EP 0623169 A JP 8509692 T JP 8509201 T WO 9314208 A US 5686239 A US 5741490 A US 5770689 A	23-03-1999 22-07-1993 22-07-1993 14-12-1994 09-11-1994 15-10-1996 01-10-1996 22-07-1993 11-11-1997 21-04-1998 23-06-1999
WO 9819162 A	07-05-1998	AU 5426898 A	22-05-1998
WO 9512677 A	11-05-1995	AU 698878 B AU 7993294 A CA 2175692 A EP 0725824 A	12-11-1998 23-05-1995 11-05-1995 14-08-1996
WO 9729129 A	14-08-1997	FR 2744725 A AU 1728397 A	14-08-1997 28-08-1997
WO 9744469 A	27-11-1997	AU 3214397 A CA 2250723 A	09-12-1997 27-11-1997
EP 0754704 A	22-01-1997	EP 0489968 A SG 47062 A AT 144993 T AU 652013 B AU 9068991 A CA 2074370 A CY 2043 A CY 2053 A DE 69029092 D DE 69029092 T DK 489968 T WO 9210514 A EP 0644202 A ES 2095852 T GR 3022089 T GR 3023664 T HK 57597 A HU 65930 A IL 100158 A JP 5503722 T US 5910404 A AT 149522 T DE 69030124 D DE 69030124 T	17-06-1992 20-03-1998 15-11-1996 11-08-1994 08-07-1992 15-06-1992 20-02-1998 30-04-1998 12-12-1996 17-04-1997 24-03-1997 25-06-1992 22-03-1995 01-03-1997 31-03-1997 30-09-1997 09-05-1997 28-07-1994 22-02-1998 17-06-1998 08-06-1999 15-03-1997 10-04-1997 18-09-1997

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De le Internationale No

PCT/FR 99/01155

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0754704 A		DK 644202 T	15-09-1992
		ES 2101388 T	01-07-1997
EP 0569309 A	10-11-1993	FR 2690921 A	12-11-1993
		CA 2095693 A	07-11-1993
EP 0770679 A	02-05-1997	DE 4034982 A	07-05-1992
		DE 4112743 A	22-10-1992
		DE 4120281 A	24-12-1992
		DE 4121431 A	07-01-1993
		AU 657497 B	16-03-1995
		AU 8700291 A	07-05-1992
		CA 2054798 A	04-05-1992
		EP 0484787 A	13-05-1992
		JP 4330098 A	18-11-1992